製品コード RR071A

研究用

TaKaRa

SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC（Perfect Real Time）

説明書

v201308Da

SYBR® *Premix Ex Taq* GC（Perfect Real Time）は、SYBR® Green I ＊[1] を用いたインターカレーター法によるリアルタイム PCR 専用試薬です。2 ×濃度のプレミックスタイプ試薬で、リアルタイムモニタリングに適した濃度の SYBR® Green I をあらかじめ含んでおり、反応液の調製が簡単です。本製品は、タカラバイオ独自の添加因子と反応液組成の改良により、GC 含量 60 ～ 70% の GC リッチな領域に対する反応性と定量性が大幅に向上しています（ターゲットサイズ：～ 200 bp を推奨）。本製品を用いることで、GC リッチなターゲットでも特別な検討を行うことなく、精度の高い解析が行えます。GC 含量 60% 以下の通常のターゲットに対しても反応性は良好ですので、同一の PCR 条件で定量解析を行うことが可能です。

本製品の適応機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
- Thermal Cycler Dice Real Time System Single (製品コード TP850/TP870)
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
- Smart Cycler® System ＊[2]/ Smart Cycler® II System ＊[2]（Cepheid 社）
- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus™ Real-Time PCR System（Life Technologies 社）
- LightCycler®/LightCycler® 480 System（Roche Diagnostics 社）など

＊ 1：Molecular Probes Inc. より研究用試薬として SYBR® Green I ライセンスを受けています。SYBR® は Molecular Probes Inc. の登録商標です。
＊ 2：Smart Cycler® は Cepheid 社の登録商標です。

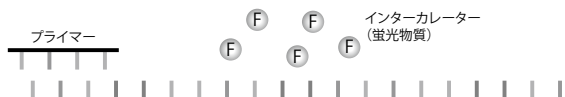
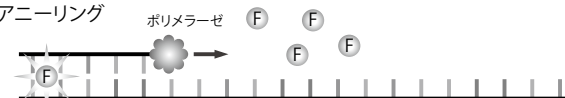
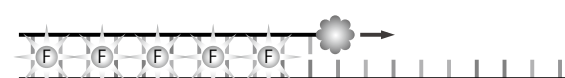
I. 原理

本製品では、*TaKaRa Ex Taq* HS による PCR 増幅を行います。PCR 増幅産物は、SYBR® Green I によりリアルタイムでモニタリングできます。

1. PCR

PCR 法は微量 DNA から目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることが出来ます。
本製品では、増幅に Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を使用しているため、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

2. 蛍光検出法

インターカレーター法
二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター：SYBR® Green I など）を反応系に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。
ポリメラーゼ反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると、蛍光を発します。この蛍光強度を検出することで、定量だけでなく増幅 DNA の融解温度を測定することもできます。

II. 内容［200 回（50 μl 反応系）］

SYBR® *Premix Ex Taq* GC (Perfect Real Time)（2×conc.）＊1	1 ml × 5 本
ROX Reference Dye（50 × conc.）＊2	200 μl
ROX Reference Dye II（50×conc.）＊2	200 μl

＊ 1： *TaKaRa Ex Taq* HS、dNTP Mixture、Mg^{2+}および SYBR® Green I を含む。
※本製品の品質規格については、14 ページをご参照ください。

＊ 2： Life Technologies 社製リアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

◆ ROX Reference Dye を添加する機種
・StepOnePlus™ Real-Time PCR System（Life Technologies 社）

◆ ROX Reference Dye II を添加する機種
・Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）

◆ 添加の必要がない機種
・Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ（製品コード TP900/TP960 など）
・Smart Cycler® System/ Smart Cycler® II System（Cepheid 社）
・LightCycler®/LightCycler® 480 System（Roche Diagnostics 社）

本製品以外に必要な試薬、機器（主なもの）

1. リアルタイム PCR 用遺伝子増幅システム（authorized instruments）
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー＊
4. 滅菌蒸留水
5. マイクロピペットおよびチップ（オートクレーブ処理したもの）

＊： リアルタイム PCR 用プライマーの設計方法は、「VII.（1）プライマー設計について」をご参照ください。ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成には、当社のオンライン検索＆注文システム【Perfect Real Time サポートシステム】のご利用を推奨します。（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）

III. 保存

4℃保存：6 ヶ月安定
必ず遮光してください。また、コンタミネーションには十分注意してください。

＊ 本製品はドライアイス直付けでお届けします。
長期保存する場合は、－ 80℃で保存してください。（－ 20℃保存は避けてください。）
いったん融解したものは 4℃保存し、6 ヶ月を目途にご使用ください。

IV. 特長

（1） リアルタイム PCR により、遺伝子の検出、定量を迅速かつ正確に行うことが可能です。

（2） SYBR® Green I があらかじめミックスしてある 2×conc. のプレミックス試薬です。プライマーとテンプレートと滅菌蒸留水を加えるだけでインターカレーター法によるリアルタイム PCR を行うことができます。

（3） PCR には、Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を用いており、サイクル前のミスプライミングに由来する非特異的増幅を防ぐことができます。さらに、独自の添加因子と反応液組成の改良により GC 含有が 60 ～ 70% の増幅しにくいターゲットの反応性が大幅に向上しています。（ターゲットサイズ：～ 200 bp を推奨）

V. 操作上の注意

本製品を使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

（1）使用時には、泡立てないよう緩やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬組成に偏りがあると十分な反応性が得られなくなります。
ボルテックスによる混合は行わないでください。

なお、SYBR® *Premix Ex Taq* GC（2×conc.）を－80℃保存した場合、保存中に白色～黄白色の沈殿を生じることがあります。軽く手で温めるか、遮光して室温にしばらく置いた後、転倒混合することで完全に溶解します。
沈殿が生じたままでは、試薬組成に偏りができますので、必ず均一に混合してからご使用ください。

（2）反応液調製時には、試薬を氷上に置いてください。

（3）本製品は SYBR® Green I を含んでいます。反応液調製時に強い光をあてないよう注意してください。

（4）反応液の調製、分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

VI. 操作

＜ Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズを用いる場合の操作方法＞

※ Thermal Cycler Dice Real Time System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq* GC（2×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
template（＜ 100 ng）	2 μl	＊2
dH_2O（滅菌蒸留水）	9.5 μl	
Total	25 μl ＊3	

＊ 1：最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

＊ 3：反応液量は 25 μl を推奨。

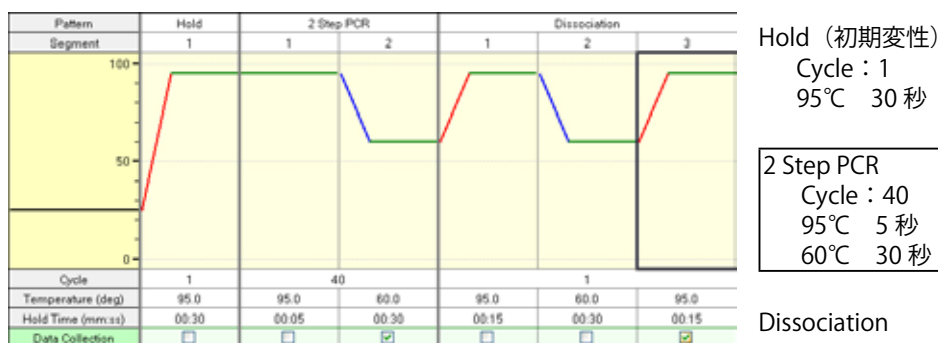
2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。PCR 条件を至適化する場合は、11 ページの「PCR 条件について」をご参照ください。

シャトル PCR 標準プロトコール

Hold（初期変性）
Cycle：1
95℃　30 秒

2 Step PCR
Cycle：40
95℃　5 秒
60℃　30 秒

Dissociation

※ 使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 Taq 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、Thermal Cycler Dice Real Time System の取扱説明書をご参照ください。

＜ Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System および StepOnePlus™ Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法＞

※ 各機種の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq* GC（2×）	10 μl	25 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM ＊ 1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM ＊ 1
ROX Reference Dye（50 ×）or Dye II（50 ×）＊ 2	0.4 μl	1 μl	1 ×
template	2 μl	4 μl	＊ 3
dH_2O（滅菌蒸留水）	6.8 μl	18 μl	
Total	20 μl ＊ 4	50 μl ＊ 4	

＊ 1： 最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 〜 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

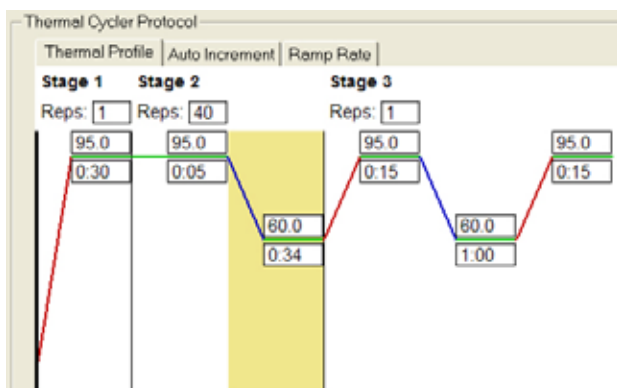
＊ 2： ROX Reference Dye II（50×）は、ROX Reference Dye（50×）より濃度が低く設定されています。7500 および 7500 Fast Real-Time PCR System で解析する場合には、ROX Reference Dye II（50×）の使用を推奨します。
StepOnePlus™ には、ROX Reference Dye（50×）を使用してください。

＊ 3： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。20 μl あたり DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

＊ 4： 各装置の推奨容量に従って調製する。

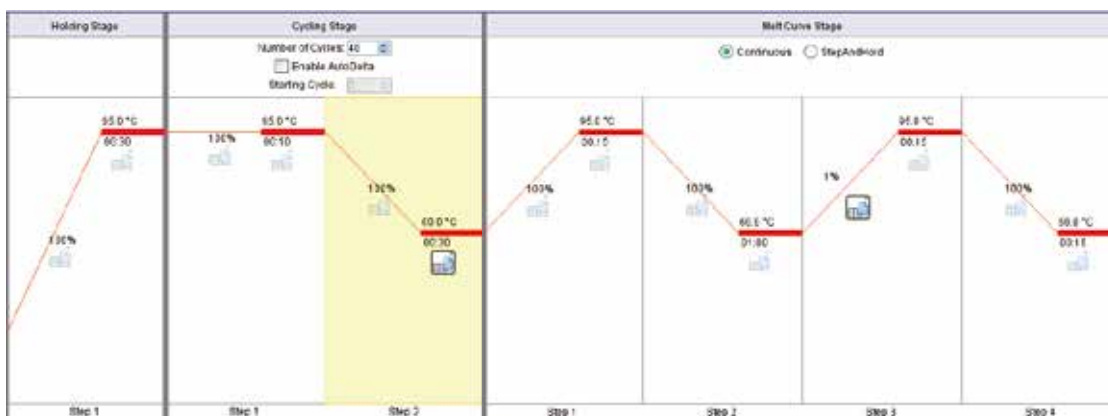
2.　反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。PCR 条件を至適化する場合は、11 ページの「PCR 条件について」をご参照ください。

＜ Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System、StepOnePlus™＞

シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
　Reps：1
　95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
　Reps：40
　95℃　5 秒
　60℃　30 or 34 秒＊
Stage 3：Melt Curve

＊：StepOnePlus™では30秒に、
　7500 では 34 秒に設定する。

＜ 7500 Fast Real-Time PCR System ＞

Holding Stage
　Reps：1
　95℃　30 秒
Cycling Stage
　Reps：40
　95℃　10 秒
　60℃　30 秒
Melt Curve Stage

> ※使用上の注意
> 本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HSはポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
> PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3.　反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

＜ LightCycler®/LightCycler® 480 を用いる場合の操作方法＞

※ Roche Diagnostics 社各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

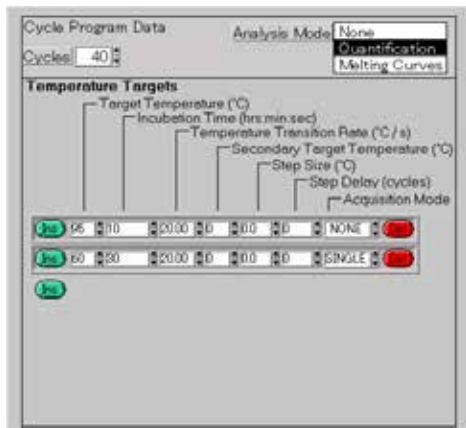
試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq* GC（2×）	10 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM ＊ 1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM ＊ 1
template（＜ 100 ng）	2 μl	＊ 2
dH_2O（滅菌蒸留水）	7.2 μl	
Total	20 μl	

＊ 1： 最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. PCR キャピラリーを遠心機で軽く遠心後、LightCycler® にセットし、反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。PCR 条件を至適化する場合は、11 ページの「PCR 条件について」をご参照ください。

＜ LightCycler® ＞

Stage 2：PCR 反応

シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
95℃ 30 秒 20℃ / 秒
1 サイクル

Stage 2：PCR 反応
95℃ 10 秒 20℃ / 秒
60℃ 30 秒 20℃ / 秒
40 サイクル

Stage 3：融解曲線分析
95℃ 0 秒 20℃ / 秒
65℃ 15 秒 20℃ / 秒
95℃ 0 秒 0.1℃ / 秒

< LightCycler® 480 システム>

シャトル PCR 標準プロトコール

Denature
95℃　30 秒 (Ramp Rate 4.4℃/sec.)
1 サイクル

PCR
Analysis Mode：Quantification
95℃　 5 秒 (Ramp Rate 4.4℃/sec.)
60℃　30 秒 (Ramp Rate 2.2℃/sec., Acquisition Mode : Single)
40 サイクル

Melting
Analysis Mode：Melting Curves
95℃　 5 秒 (Ramp Rate 4.4℃/sec.)
60℃　 1 分 (Ramp Rate 2.2℃/sec.)
95℃　　　(Ramp Rate 0.11℃/sec.,
Acquisition Mode : Continuous, Acquisitions : 5 per℃)
1 サイクル

Cooling
50℃　30 秒 (Ramp Rate 2.2℃/sec.)
1 サイクル

> ※使用上の注意
> 本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 〜）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
> PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
   解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

＜ Smart Cycler® II System を用いる場合の操作方法＞

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq* GC（2×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊ 1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊ 1
template（＜ 100 ng）	2 μl	＊ 2
dH_2O（滅菌蒸留水）	9.5 μl	
Total	25 μl	

＊ 1：最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. 反応チューブを Smart Cycler® 用遠心機で軽く遠心後、Smart Cycler® にセットし、反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。PCR 条件を至適化する場合は、11 ページの「PCR 条件について」をご参照ください。

シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
Hold
95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
Repeat：40 times
95℃　10 秒
60℃　30 秒
Stage 3：Melt Curve

> ※ 使用上の注意
> 本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
> PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

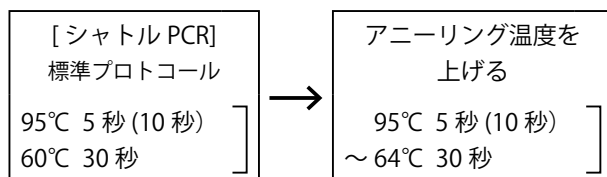
3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

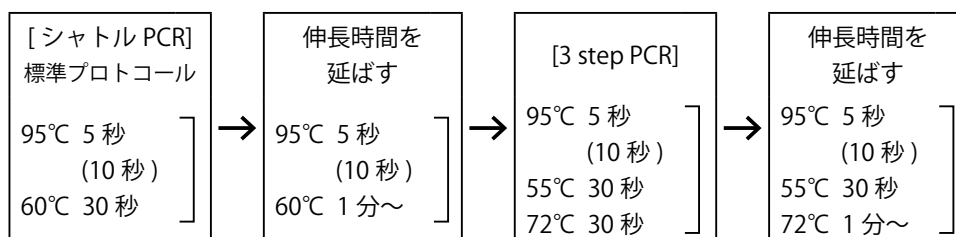
解析方法は、Smart Cycler® System の取扱説明書をご参照ください。

PCR 条件について

【PCR 条件の検討】

○ 反応特異性を上げるには―

アニーリング温度を上げると反応特異性が改善することがあります。増幅効率とのバランスを確認しながら、検討を行ってください。

○ 増幅効率を上げるには―

伸長時間を延ばすか、3 step PCR に変更することにより、増幅効率が改善することがあります。以下の手順で検討を行ってください。

【初期変性】

初期変性は通常 95℃、30 秒で充分です。環状プラスミドやゲノム DNA など変性しにくい鋳型でも、ほとんどの場合、この条件で良好に反応できます。鋳型の状態によっては、95℃、1 ～ 2 分程度に延長することが可能ですが、時間が長すぎると酵素の失活を招く恐れがありますので、2 分以上の条件は推奨しません。

VII. Appendix

（1）プライマー設計について

リアルタイム PCR を効率的に行うには、反応性の良いプライマーを設計することが重要です。以下のガイドラインに沿って、増幅効率がよく、非特異的反応が起こらないプライマーを設計してください。

なお、ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成には、当社オンライン検索 ＆ 注文システム【Perfect Real Time サポートシステム】＊のご利用を推奨します。

（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）

＊：ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリの RefSeq に対してリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです（ご注文によりカスタム合成してお届けします）。本キットと組合せて、SYBR® Green I 検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。
本システムを利用して RT-PCR プライマーを設計・合成された場合には、シャトル PCR 標準プロトコールで反応できます（P. 5 ～ 10 参照）。

■増幅産物

増幅サイズ	80 ～ 150 bp が最適

■プライマー

長さ	17 ～ 25 mer
GC 含量	40 ～ 60%（望ましくは、45 ～ 55%）＊1
Tm	Forward primer と Reverse primer の Tm 値が大きく異ならないこと。 Tm 値の計算は、専用のソフトウェアで行う。 OLIGO ＊2：63 ～ 68℃ Primer3 ＊3：60 ～ 65℃
配列	全体的に塩基の偏りがない配列にする。 部分的に GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける（特に 3' 末端）。 T/C の連続（polypyrimidine）は避ける。 A/G の連続（polypurine）は避ける。
3' 末端配列	3' 末端が GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける。 3' 末端塩基は、G または C が望ましい。 3' 末端塩基が T であるプライマーは避けたほうがよい。
相補性	プライマー内部およびプライマー間での 3 base 以上の相補的配列を避ける。 プライマーの 3' 末端同士が 2 base 以上相補する配列を避ける。
特異性	BLAST 検索でプライマーの特異性を確認する＊4。

＊1：本製品を用いて GC リッチなターゲットを増幅する場合、45 ～ 65%（望ましくは 50 ～ 60%）で設計する。
＊2：OLIGO™ Primer Analysis Software（Molecular Biology Insights 社）
＊3：Primer3（http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/software/）
＊4：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

※ タカラバイオ (株) では、【Perfect Real Time サポートシステム】に対応していない遺伝子についても、プライマーのカスタム設計・合成サービスを行っております。
詳細は、弊社各支店までお問い合わせください。
（東京支店：TEL 03-3271-8553、関西支店：TEL 077-565-6969）

（2）RT-PCR を行う場合

RT 反応には

・PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR037A/B）
・PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）
・PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)（製品コード RR047A/B）

の使用をお勧めします。本製品と組み合わせて使用することにより、信頼性の高い結果を得ることができます。以下には PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR037A）を用いた例を示します。

1. 下記に示す逆転写反応液を氷上で調製する。
   RNA サンプル以外のコンポーネントを必要な本数＋α 調製し、マイクロチューブに分注後、RNA サンプルを添加すると良い。

<1 反応あたり>

試薬	使用量	最終濃度
5 × PrimeScript® Buffer（for Real Time）	2 μl	1 ×
PrimeScript® RT Enzyme Mix I	0.5 μl	
Oligo dT Primer（50 μM）＊1	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers（100 μM）＊1	0.5 μl	50 pmol
total RNA		
RNase Free dH_2O		
Total	10 μl ＊2	

＊1：Oligo dT Primer と Random 6 mers の両方を用いると mRNA 全長にわたり効率よく cDNA が合成されます。なお、各プライマーを単独で用いる場合および Gene Specific Primer の場合の使用量は以下の通りです。

プライマー	使用量	添加量
Oligo dT Primer（50 μM）	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers（100 μM）	0.5 μl	50 pmol
Gene Specific Primer（2 μM）	0.5 μl	1 pmol

＊2：逆転写反応は、必要に応じてスケールアップしてください。10 μl の反応液で逆転写出来るのは、およそ 500 ng までの total RNA です。

2. 逆転写反応を行う。
   37℃、15 分＊3（逆転写反応）
   85℃、5 秒　（逆転写酵素を熱失活させる）
   4℃

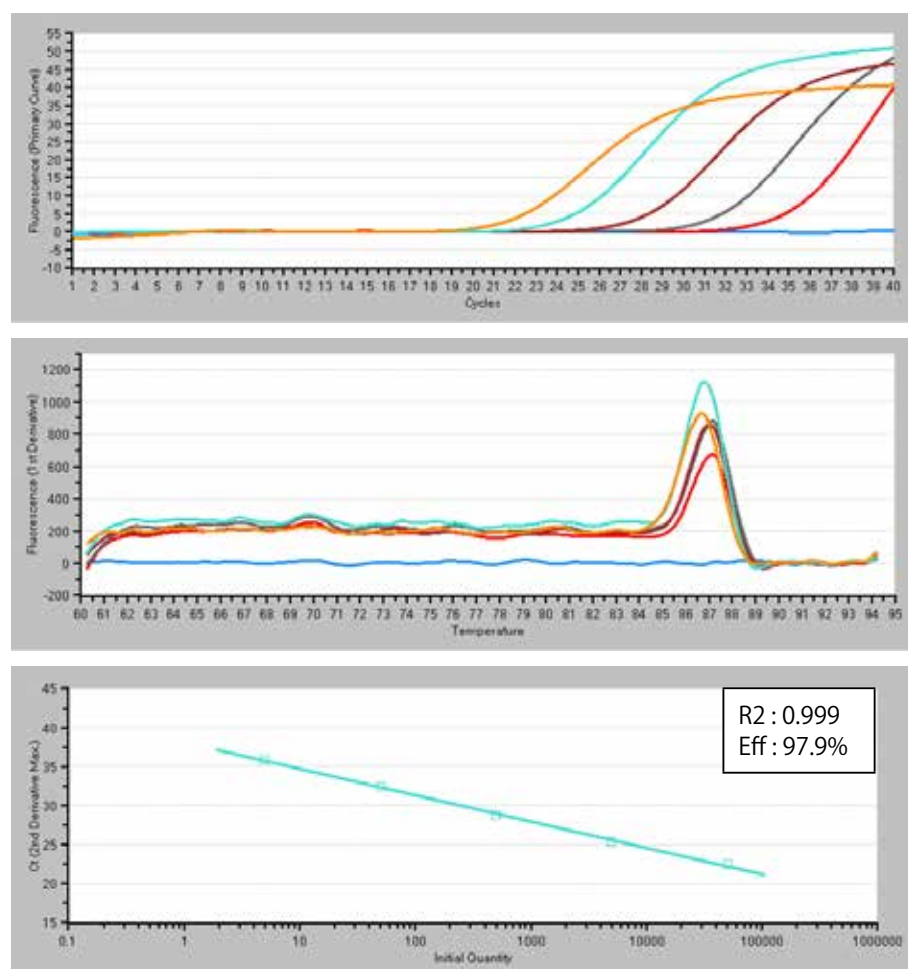
＊3：Gene Specific Primer を用いる場合：
逆転写反応を 42℃、15 分で行ってください。PCR で非特異的な増幅が生じた場合には、逆転写温度を 50℃に変更すると改善される場合があります。

3. PCR反応液を下記の通り調製する。(Thermal Cycler Dice Real Time System使用の場合)
以下のコンポーネントを必要本数＋α調製し、22.5 ～ 24 μl ずつ分注する。

＜1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq* GC（2×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM
dH_2O（滅菌蒸留水）	x μl	
Total	22.5 ～ 24 μl	

4. 反応液を分注したチューブに逆転写反応液を 1 ～ 2.5 μl 添加する。＊
＊：PCR 反応への逆転写反応液の持込み量は、2.5 μl 以下にしてください。

■反応例

RT-PCR により Human SYNGR3 mRNA を検出した（増幅産物の GC 含量 63.5%）。total RNA 5 pg ～ 50 ng 相当量の cDNA および Negative Control として dH_2O を鋳型とした。

VIII. 品質規格について

○ 品質検定　　Thermal Cycler Dice Real Time System でのマウス心臓cDNAおよびHL60 cDNAを鋳型としたリアルタイム PCR 反応（増幅産物 98 bp および 87 bp）において、良好かつ安定した増幅と SYBR® Green I 検出を確認している。

TaKaRa Ex Taq HS について
○ 活性の定義　活性化サケ精子 DNA を鋳型／プライマーとして用い、下記の活性測定用反応液中にて 74℃において、30 分間に 10 nmol の全ヌクレオチドを酸不溶性沈殿物に取り込む活性を 1 U とする。

○ 活性測定用反応液組成

25 mM	TAPS 緩衝液（pH9.3, 25℃）
50 mM	KCl
2 mM	$MgCl_2$
0.1 mM	DTT
各 200 μM	dATP, dGTP, dTTP
100 μM	$[^3H]$-dTTP
0.25 mg/ml	活性化サケ精子 DNA

○ 純度
1. 10 U の本酵素と 0.6 μg の λ-*Hin*d III 分解物を 74℃、1 時間反応させても DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。
2. 10 U の本酵素と 0.6 μg の supercoiled pBR322 DNA を 74℃、1 時間反応させても DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。
3. 10 U の本酵素と 0.6 μg の λ DNA を 74℃、1 時間反応させても DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。

IX. 関連製品

SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR420S/A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820S/A/B）
SYBR® Premix DimerEraser® (Perfect Real Time)（製品コード RR091A/B）
PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR037A/B）
PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）
PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)（製品コード RR047A/B）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System Single (製品コード TP850/TP870)
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
Smart Cycler® II System（製品コード SC200N/SC210N）

Perfect Real Time サポートシステム（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）
　ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリの RefSeq に対してリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです（ご注文によりカスタム合成してお届けします）。本製品と組合せて、SYBR® Green I 検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。

X. 参考文献

1）吉崎美和 , 向井博之（2005）実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」, 第 3 章 核酸の検出と定量のコツ 4. リアルタイム定量 PCR のコツ, 120-126
2）吉崎美和 , 向井博之（2008）実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1）リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 , 39-43

XI. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- SYBR® は Molecular Probe Inc. の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[L11] SYBR® Green I
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 5,436,134 and 5,658,751 and their foreign counterpart patent claims.
Takara PCR products containing SYBR® Green I are sold under license from Molecular Probes Inc. only for the usage in Real-time PCR for internal research purpose. These products are not to be used for the purpose such as; providing medical, diagnostic, or any other testing, analysis or screening services or providing clinical information or clinical analysis in return for compensations.

[L15] Hot Start PCR
Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

[L46] SYBR/Melting Curve Analysis
The purchase of this product includes a limited, non-transferable license for all fields other than human or veterinary in vitro diagnostics under specific claims of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, owned by the University of Utah Research Foundation or Evotec Biosystems GmbH and licensed to Idaho Technology, Inc. and Roche Diagnostics GmbH, to use only the enclosed amount of product according to the specified protocols. No right is conveyed, expressly, by implication, or by estoppel, to use any instrument or system under any claim of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, other than for the amount of product contained herein.

[L52] Rox Reference Dye (Research Field)
Purchase of this product includes an immunity from suit under patents specified in the product insert to use only the amount purchased for the purchaser's own internal research. No other patent rights are conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 outside the U.S. corresponding to the expired U.S. Patent No. 5,436,149.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/
タカラバイオ株式会社

v201308Da